

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 60-156385

(43)Date of publication of application : 16.08.1985

(51)Int.Cl.

C12N 9/02
 //(C12N 9/02
 C12R 1:645)

(21)Application number : 58-203394

(71)Applicant : KYOWA HAKKO KOGYO CO LTD

(22)Date of filing : 29.10.1983

(72)Inventor : ARAI TAKEMITSU
 TAMURA SHIGEAKI
 KATSUMATA HIDEO
 KAWAI MASANOBU

(54) PREPARATION OF LACCASE

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain laccase industrially advantageously, by cultivating a specific fungus belonging to the genus *Irpe*x, *Auricularia*, etc., capable of producing laccase.

CONSTITUTION: A fungus belonging to the genus *Irpe*x, *Auricularia*, *Ganoderm*, *Coprinus*, *Daedaleopsis*, or *Flammulina*, capable of producing laccase, is cultivated in a nutritive medium. Then, laccase is collected from the prepared culture. *Irpe*x *lacteus*, *Auricularia* *polytricha*, *Ganoderm* *lucidum*, etc. may be cited as the strain used. Any of natural medium and synthetic medium can be used as the nutritive medium on condition that it contains properly a carbon source, nitrogen source, inorganic substance, and, if necessary, a very small amount of nutrient.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C) 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-156385

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)8月16日

C 12 N 9/02
// (C 12 N 9/02
C 12 R 1:645)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 ラッカーゼの製造法

⑯ 特 願 昭58-203394

⑰ 出 願 昭58(1983)10月29日

⑱ 発 明 者	新 井 雄 光	裾野市茶畑2016-40
⑲ 発 明 者	田 村 繁 昭	駿東郡長泉町納米里410-1
⑳ 発 明 者	勝 又 英 雄	御殿場市北久原613-5
㉑ 発 明 者	川 合 正 允	厚木市毛利台3-32-15
㉒ 出 願 人	協和発酵工業株式会社	東京都千代田区大手町1丁目6番1号

明細書の序言(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

ラッカーゼの製造法

2. 特許請求の範囲

イルベックス属、オウリキュラリア属、ガノデルム属、コブリナス属、ダエダレオプシス属又はフラムリナ属に属し、ラッカーゼ生産能を有する微生物を栄養培地に培養し、得られた培養物から、ラッカーゼを採取することを特徴とするラッカーゼの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、イルベックス属、オウリキュラリア属、ガノデルム属、コブリナス属、ダエダレオプシス属又はフラムリナ属に属し、ラッカーゼ生産能を有する微生物を栄養培地に培養し、得られた培養物から、ラッカーゼを採取することを特徴とするラッカーゼの製造法に関する。

ラッカーゼ(E. C. 1.10.3.2)は、パラ・ジフェノール(p-diphenol)、オルト・ジフェノール(o-diphenol)またはポリ・フェノール(Poly phenol)を酸化しそれぞれのキノン(quinone)に酸化する反応を触媒する酵素であり、植物、微生物に広く分布することが知られて

いる。近年診断用試薬として酵素法による発色系が広く用いられるようになったが、本発明者等は新しい発色系を触媒する酵素について鋭意検討を行った結果、ラッカーゼがアミン類化合物とフェノール類化合物を分子状酸素の存在下に酸化縮合し、色素を生成する反応を触媒することを見出した。本反応系は、新しい発色系として診断用試薬等に利用できることからラッカーゼの工業的製造法を開発すべく、その供給源を微生物界に求め鋭意検討を行った。ラッカーゼの微生物における存在については、ポドスポラ属(Podospora)、[Archiv für Microbiologie (1963)]、ポリスポラ属(Polyspora) [Acta Chemica Scandinavica (1967)] やノイロスボラ属(Neuospora) [Journal of Bacteriology 120, 458 (1974)] 等のカビ類及びコリオラス属(Coriolus)、ポリボラス(Polyporus) プレウロタス属(Pleurotus) [発酵協会誌20, 293 (1962)] 等の担子菌が知られている。

本発明者等は担子菌のラッカーゼに着目し、検索したところイルベックス属、オウリキュラリア属、ガノデルム属、コブリナス属、ダエダレオプシス属及びフラムリナ属に属する微生物がラッカーゼ高生産能を有することを見出し、これら微

特開昭60-156385(2)

生物よりラッカーゼを工業的安価に製造する方法を確立し、本発明を完成した。以下本発明について詳細に説明する。

本発明に使用される菌株としては例えば、イルベックス・ラクテウス (*Lrpex lacteus*) ATCC-20123、オウリキュラリア・ポリトリカ (*Auricularia polytricha*) 2-229 (微工研菌寄 № 7119)、ガノデルム・ルンダム (*Ganoderma lucidum*) 2-262 (微工研菌寄 № 7120)、コプリナス・ミカセウス (*Coprinus micaceus*) ATT-20122、ダエダレオプシス・ステラシナ (*Daedaleopsis styracina*) ATCC-20188、フラムリナ・ベルチベス (*Flammulina velutipes*) ATCC-13547 があげられる。菌株の性質については、伊藤雄哉著「日本菌類誌」第2巻、養賢堂(1955)に記載されている。

本発明に使用する栄養培地としては炭素源、窒素源、無機物および必要に応じ使用菌株の必要とする微量栄養素を程よく含有するものであれば天然培地、合成培地のいずれもよい。

炭素源としてはグルコース、フラクトース、糖蜜、デキストリン、デンプン、グリセリンなどの炭水化物などが用いられる。窒素源としては塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、尿素、硝酸アンモニウム、硝酸ソーダ、グルタミン酸などのア

ミノ酸などの無機有機窒素化合物、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンステアープリカー、大豆粉、大豆粕、乾酵母、カザミノ酸、ゾリユブルベジタブルプロテインなどの窒素含有天然物等が使用できる。

無機物としてはリン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムなどが用いられる。

その他にビタミン、チアミン等の微量栄養素を必要に応じ使用する。

培養は、固体培養でもよいが通常液体又又は通気攪拌液体培養で行う。培養温度は20~40℃、培地pHは3~7にて2~6日間培養する。こうして培養液中に生成蓄積されたラッカーゼは固体を分離したのち、上清液より通常酵素精製に用いられる方法例えば、塩析、有機溶媒沈殿、透析、等電点沈殿、吸着体及びイオン交換体を用いるカラムクロマトグラフィー等の方法を組み合わせて単離精製できる。

ラッカーゼは血清中のビリルビン、アスコルビン酸及び尿酸等にも作用を及ぼすので、種々の血清中の物質、例えばトリグリセライドなどの測定の際に本発明のラッカーゼを用いることによって

ビリルビン、アスコルビン酸及び尿酸等が測定系に及ぼす悪影響を回避することができる。またビリルビン自身の吸光度減少法を利用したビリルビン等の定量へも応用できる。

ラッカーゼの活性の測定法は種々あるが本発明においては、ラッカーゼによって4-アミノアンチピリンとフェノールが酸化縮合し定量的に発色する作用を利用してラッカーゼの活性を測定した。即ち、

1.0 mM 4-アミノアンチピリン 0.2 ml,
1.0 mM phenol 0.2 ml, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 2.5 ml を混合し、37℃、5分間放置後、測定すべき酵素液 0.1 ml を添加し、37℃ 10分間反応させ、吸光度 OD nm (E₁) を分光光度計により測定する。一方同じ操作にて酵素液の代りに水 0.1 ml を添加し、吸光度 OD nm (E₂) を測定する。酵素力価は下記の式により求め、1分間に1μMの色素を生成する酵素量を1単位 (U) とした。

ラッカーゼ力価 (U/ml) =

$$(E_1 - E_2) \times \frac{1}{5.33} \times \frac{3.0}{0.1} \times \frac{1}{10}$$

次いで本発明を実施例によって説明する。

実施例1.

イルベックス・ラクテウス ATCC 20123 を 250 ml 三角フラスコ中のグルコース 2.0%、シュクロース 1.0%、大豆粕 2.0%、コーンステアープリカー 0.5%、K₂HPO₄ 0.1%、MgSO₄ · 7H₂O 0.05%、FeCl₃ 6H₂O 10 r/ml (pH 6.0) を含有する 300 ml の培地に接種し 28℃ で 4日間培養する。得られる種培養液 300 ml を培養フラスコに入れた前記と同じ組成を有する種培養培地 300 ml に接種し 28℃、4日間振盪培養する。得られる種培養液 1.2 l を 30 l ジャーフェーメンターに入れた前記と同じ組成を有する発酵培地 15 l に接種し、30℃、250 r.p.m. 通気量 15 l/min で 3日間培養を行う。

培養終了した培養液 15 l を吸引濾過して、固体を濾別し、約 10 l の上清液に硫酸を 0.7 飽和添加し、該酵素の粗沈殿物を得る。この沈殿物を脱イオン水 700 ml に溶解し、セロファンチューブにて透析後、ダイアイオン HPA-75 (三愛化成社製) の 500 ml カラムを通過させる。通過液 1 l に硫酸を 0.7 飽和添加し、該酵素の沈殿物を得る。この沈殿物を脱イオン水 200 ml に溶解し、DEAE-Cellulose 100 ml カラムに吸着させ

特開昭60-156385(3)

0.05M 緩液中で洗浄後、0.1M 緩液にて該酵素を
 抽出する。抽出液150mlを限外濾過膜にて濃縮
 し400U/mlの酵素液10mlを得る。

ここで得られた酵素の性質は以下のとおりである。

- 1) 至適 pH
 pH 4.5 付近にある (第1図)
- 2) 至適温度
 50℃ 付近にある。(第2図)
- 3) pH 安定性
 37℃、60分処理で pH 4~8 では 90
 % 以上残存活性がある。(第3図)
- 4) 温度安定性
 pH 6.5 分処理で 50℃ まで安定 (第4図)
- 5) 等電点
 pH 3~10 のキャリア・アンホライトを用
 い測定した結果等電点は 3.1 であった。
- 6) 分子量
 セファクリル-S-300 (ファルマシア社
 製) を用いたゲル濾過法にて測定した結果、
 分子量 72,300 であった。

実施例 2.

2.8 容三角フラスコ中の実施例 1 と同様の培地
 300ml に第 1 表に示す菌株を接種し、28℃、
 4日間培養し、第 1 表に示す活性のラッカーゼを

得る。

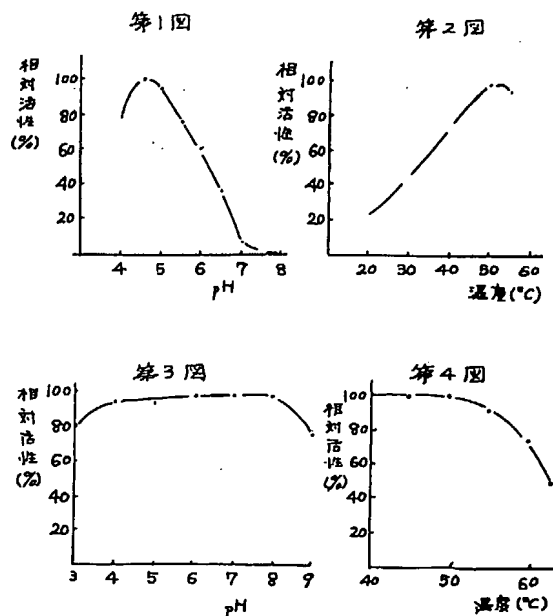
菌株名	ラッカーゼ活性 (-U/ml)
イルベックス・ラクナウス ATCC-20123	1.56
オウリキュラリア・ポリトリカ Z-229	1.51
ガノデルム・ルシダム Z-262	0.64
コブリナス・ミカセウス ATCC-20122	0.47
ダエダレオプシス・スチランサ ATCC-20188	0.35
フラムリナ・ベルチベス ATCC-13547	0.32
(生産能が知られている菌株)	
コロラス・ベルンカラー IPD-4937	0.63
ポリボラス・ベルンカラー ATCC-20155	0.01
プレウロタス・オストレアタス NRRL-12507	0.28

4. 図面の簡単な説明

第 1~4 図はそれぞれ本発明のラッカーゼの至
 適 pH、至適温度、pH 安定性及び温度安定性を
 示す。

特許出願人 (102) 協和薬工株式会社

代表者 木下 祝 郎



手続補正書(方式)

特開昭60-156385(4)

昭和60年3月6日

特許庁長官 殿

1. 事件の表示

昭和58年特許第203394号

2. 発明の名称

ラッカーゼの製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所 東京都千代田区大手町一丁目6番1号

名 称 (102) 協和醗酵工業株式会社

(TEL: 03-201-7211 内線2751)

代表者 加 藤 幹 夫

4. 補正命令の日付

昭和59年1月11日(発送日: 昭和59年1月31日)

5. 補正の対象

明 細 書

6. 補正の内容

明細書の浄書(内容に変更なし)